



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

#4
D. Scott
622-02

Aktenzeichen: 101 08 483.8

Anmeldetag: 22. Februar 2001

Anmelder/Inhaber: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT,
Leverkusen/DE

Bezeichnung: Phosphorhaltige Polymere für optischen
Signalwandler

IPC: C 08 G, C 09 D, G 02 B

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 06. Dezember 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Jerofsky

Phosphorhaltige Polymere für optischen Signalwandler

5 Die Erfindung betrifft ein phosphorhaltiges Polymer zur Beschichtung von dielektrischen Materialien und dessen Verwendung sowie einen optischen Signalwandler mit einer Beschichtung aus dem Polymer und dessen Verwendung.

10 Dielektrische Materialien werden mit multifunktionellen Polymeren zur Bio- und Chemofunktionalisierung beschichtet, d.h. mit dem Ziel, chemische und/oder biochemische ((bio-)chemische) Erkennungselemente, wie z.B. Rezeptoren, Antikörper, DNA etc., an deren Oberfläche immobilisieren zu können. Solche beschichtete dielektrische Materialien, z.B. beschichtete optische Wellenleiter, finden Anwendung als Signalwandler (Transducer), wie sie in der Sensorik bei Bio- oder Chemosensoren eingesetzt werden.

15 Als Bio- oder Chemosensoren bezeichnet man Geräte, die mit Hilfe eines Signalwandlers und einer Erkennungsreaktion einen Analyten qualitativ oder quantitativ nachweisen können. Als Erkennungsreaktion wird ganz allgemein die spezifische Bindung oder Reaktion eines sogenannten Analyten mit einem sogenannten Erkennungselement bezeichnet. Beispiele für Erkennungsreaktionen sind die Bindung von
20 Liganden an Komplexe, die Komplexierung von Ionen, die Bindung von Liganden an (biologische) Rezeptoren, Membranrezeptoren oder Ionenkanäle, von Antigenen oder Haptenen an Antikörper, von Substraten an Enzyme, von DNA oder RNA an bestimmte Proteine, die Hybridisierung von DNA/RNA/PNA oder die Prozessierung von Substraten durch Enzyme. Analyten können sein: Ionen, Proteine, natürliche
25 oder künstliche Antigene oder Haptene, Hormone, Cytokine, Mono- und Oligosaccharide, Stoffwechselprodukte, oder andere biochemische Marker, die in der Diagnostik verwendet werden, Enzymsubstrate, DNA, RNA, PNA, potentielle Wirkstoffe, Medikamente, Zellen, Viren. Beispiele für Erkennungselemente sind: Komplexbildner für Metalle/Metallionen, Cyclodextrine, Kronenether, Antikörper, Antikörperfragmente, Anticaline¹, Enzyme, DNA, RNA, PNA, DNA/RNA-bindende Protei-
30

ne, Enzyme, Rezeptoren, Membranrezeptoren, Ionenkanäle, Zelladhäsionsproteine, Ganglioside, Mono- oder Oligosaccharide.

5 Diese Bio- oder Chemosensoren können in der Umweltanalytik, dem Nahrungsmittelbereich, der Human- und Veterinärdiagnostik und dem Pflanzenschutz eingesetzt werden, um Analyten qualitativ und/oder quantitativ zu bestimmen. Die Spezifität der Erkennungsreaktion ermöglicht es, auch Analyten in komplexen Proben wie z.B. Umgebungsluft, verschmutztem Wasser oder Körperflüssigkeiten ohne oder nur mit geringer vorherige Aufreinigung qualitativ oder quantitativ zu bestimmen. Zusätzlich
10 können Bio- oder Chemosensoren auch in der (bio-) chemischen Forschung und Wirkstoffsuche eingesetzt werden, um die Interaktion zwischen zwei unterschiedlichen Substanzen zu untersuchen (z.B. zwischen Proteinen, DNA, RNA, oder biologisch aktiven Substanzen und Proteinen, DNA, RNA etc.).

15 Die Integration der Erkennungsreaktion mit dem Signalwandler zu einem Bio- oder Chemosensor kann geschehen, indem man das Erkennungselement oder den Analyten auf der Oberfläche des Signalwandlers immobilisiert. Durch die Erkennungsreaktion, d.h. das Binden oder die Reaktion des Analyten mit dem Erkennungselement, ändern sich die optischen Eigenschaften des Mediums direkt an der Oberfläche des
20 Signalwandlers (z.B. Änderung des optischen Brechungsindex, der Absorption, der Fluoreszenz, der Phosphoreszenz, der Lumineszenz etc.), was vom Signalwandler in ein Messsignal übersetzt wird.

Optische Wellenleiter sind eine Klasse von Signalwandlern, mit denen man die Änderung der optischen Eigenschaften eines Mediums detektieren kann, das an eine
25 wellenleitende Schicht, typischer Weise ein Dielektrikum, grenzt. Wird Licht als geführte Mode in der wellenleitenden Schicht transportiert, fällt das Lichtfeld an der Grenzfläche Medium/Wellenleiter nicht abrupt ab, sondern klingt in dem an den Wellenleiter angrenzenden sogenannten Detektionsmedium exponentiell ab. Dieses
30 exponentiell abfallende Lichtfeld wird als evaneszentes Feld bezeichnet. Werden sehr dünne Wellenleiter verwendet, deren Brechungsindex möglichst stark von dem des

- angrenzenden Mediums differiert, werden Abfalllängen des evaneszenten Feldes (Intensität fällt auf den Wert $1/e$ ab) von <200 nm erreicht. Ändern sich die optischen Eigenschaften des an den Wellenleiter grenzenden Mediums (z.B. Änderung des optischen Brechungsindex^{2,3}, der Lumineszenz^{4,5,6} etc.) innerhalb des evaneszenten
- 5 Feldes, kann dies über einen geeigneten Messaufbau detektiert werden. Entscheidend für die Verwendung von Wellenleitern als Signalwandler in Bio- oder Chemosensoren ist dabei, dass die Änderung der optischen Eigenschaften des Mediums nur sehr nahe an der Oberfläche des Wellenleiters detektiert wird. Wird nämlich das Erkennungselement oder der Analyt an der Grenzfläche des Wellenleiters immobilisiert,
- 10 kann das Binden an das Erkennungselement oder die Reaktion des Erkennungselementes oberflächensensitiv detektiert werden, wenn sich dabei die optischen Eigenschaften des Detektionsmediums (flüssig, fest, gasförmig) an der Grenzfläche zum Wellenleiter ändern.
- 15 Bei der Verwendung von optischen Wellenleitern als Bio- oder Chemosensoren werden an die Grenzfläche Wellenleiter zu Detektionsmedium hohe Anforderungen gestellt:
- Unter den Reaktionsbedingungen der Erkennungsreaktion muss die Grenzfläche
 - 20 Wellenleiter Detektionsmedium stabil sein.
 - Die Erkennungselemente müssen innerhalb der Reichweite des evaneszenten Feldes des Wellenleiters immobilisiert werden.
 - Unter den Reaktionsbedingungen der Erkennungsreaktion muss die Immobilisierung der Erkennungselement stabil sein.
 - 25 • Die Funktionalität der Erkennungselemente muss auch nach der Immobilisierung noch vorhanden sein.
 - Damit nur die spezifische Erkennungsreaktion durch den Signalwandler detektiert wird, muss jede Art von unspezifischer Bindung an die Grenzfläche Wellenleiter Detektionsmedium unterdrückt werden.

An die Oberfläche von Wellenleitern können auf verschiedenste Weise Erkennungselemente immobilisiert werden. Dies kann z.B. durch Physisorption der Erkennungselemente auf die Signalwandleroberfläche geschehen. Clerc und Lukosz⁷ beschreiben die Physisorption von Avidin auf SiO₂-TiO₂ Wellenleiteroberflächen. In einem zweiten Schritt können unter Ausnutzung der hochaffinen Avidin-Biotin Bindung biotinylierten Antikörpern an die so aufgetragenen Avidin Schichten immobilisiert werden. Ein Nachteil dieser Immobilisierungsmethode von Erkennungselementen auf Wellenleiteroberflächen ist die Instabilität der physisorbierten Avidinschicht. Eine Änderung der Reaktionsbedingungen, wie z.B. Temperaturänderungen, pH-Änderungen, Zugabe von Detergenzien etc., kann zu einer Desorption der Avidinschicht und damit auch des Antikörpers führen.

Die Erkennungselemente können auch kovalent an die Oberfläche eines Wellenleiters gebunden werden. Eine Möglichkeit dazu stellen bifunktionelle Silane dar, die eine kovalente Bindung mit der Wellenleiteroberfläche eingehen⁸. Über eine zweite funktionelle Gruppe in diesem Silan können nun die Erkennungselemente, wie z.B. Proteine oder DNA⁹, kovalent gebunden werden. Diese bifunktionellen Silane sind sehr reaktiv und bei der kovalenten Bindung an die Wellenleiteroberfläche muss unter absolut trockenen Reaktionsbedingungen gearbeitet werden, um eine Hydrolyse des reaktiven Silans zu vermeiden. Die Bindung der Erkennungselemente über diese Silane an die Wellenleiteroberflächen ist bei sauren, neutralen und leicht basischen Bedingungen stabil. Bei pH-Werten über 9 kann aber eine Hydrolyse des Silans eintreten, was zu einer Desorption der Erkennungselemente von der Oberfläche führen kann. Ein weiterer Nachteil dieser Immobilisierungsmethode liegt in der relativ hohen unspezifischen Adsorption von Proteinen wie z.B. Albumin an die so funktionalisierten Wellenleiteroberflächen¹⁰. Die unspezifische Bindung an diese Wellenleiteroberflächen kann reduziert werden, indem nach der Bindung der Erkennungselemente in einem zweiten Schritt Blockierungsagenzien wie z.B. Polyethylenglycole¹¹ an die Oberfläche gebunden werden.

Alternativ wird die Bindung von hydrophilen Polymeren, wie z.B. Polyacrylamide, Dextrane, Polyethylenglycole etc. an zuvor silanisierte Wellenleiteroberflächen beschrieben¹². Diese Polymere haben die Aufgabe, die unspezifische Bindung von Proteinen etc. an die Oberfläche zu minimieren. Die Erkennungselemente werden dann in einem weiteren Schritt an diese Polymere kovalent gebunden. Problematisch bei dieser Oberflächenfunktionalisierung ist, dass mehrere Schritte zur Immobilisierung der Erkennungselemente an der Oberfläche durchgeführt werden müssen und die Instabilität der Silanbindung an die Wellenleiteroberflächen bei $\text{pH} > 9$.

Die Erkennungselemente können auch an Polymere gebunden werden, die ohne vorangegangene Silanisierung direkt auf die Wellenleiterschichten aufgebracht werden. Geladene Copolymere basierend auf Polylysin und Polyethylenglycol adsorbieren elektrostatisch auf einige Metalloxid Oberflächen¹³, wie TiO_2 , $\text{Si}_{0,4}\text{Ti}_{0,6}\text{O}_2$ und Nb_2O_5 . Mit Hilfe von optischen Wellenleitern konnte gezeigt werden, dass diese Polymere die unspezifische Bindung von Proteinen an Wellenleiteroberflächen minimiert. Eine Verwendung dieser Copolymere in der Biosensorik wird von den Autoren diskutiert. Ein Nachteil dieser Methode stellt die Instabilität dieser Schichten gegenüber pH-Werten von kleiner 3 und größer 9, sowie gegenüber hohen Salzkonzentrationen dar, da unter diesen Bedingungen das elektrostatisch gebundene Polymer von der Oberfläche desorbiert.

Polymere, die entweder mit photoaktivierbaren Gruppen derivatisiert sind¹⁴ oder zusammen mit Photocrosslinkern inkubiert werden^{15,16}, können per Photoreaktion direkt auf die Wellenleiteroberfläche aufgebracht und miteinander vernetzt werden. Diese Polymerschichten weisen eine geringe unspezifische Adsorption von Proteinen auf und sind über einen weiten Bereich von Reaktionsbedingungen stabil. Die Erkennungselemente können entweder während der Photoreaktion gebunden werden oder nach der Photoreaktion. Für die zuletzt beschriebene Immobilisierung werden Polymere verwendet, die neben den photoreaktiven Gruppen auch funktionelle Gruppen tragen, die eine kovalente Immobilisierung der Erkennungselemente ermöglichen. Die photoreaktiven Verbindungen müssen entweder per Spotter oder

Spincoating auf die Oberfläche aufgebracht und dort aufkonzentriert oder eingetrocknet werden. Dabei kann es zur partiellen Entnetzung der Wellenleiteroberfläche kommen, was in einer unvollständigen Bedeckung resultiert.

5 In der wissenschaftlichen Literatur wird das Beschichten von Ta_2O_5 Wellenleiteroberflächen mit langkettigen Alkylphosphaten der allgemeinen Formel $\text{H}_2\text{O}_3\text{P}-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ beschrieben¹⁷. Es konnte gezeigt werden, dass diese langkettigen Phosphate dicht gepackte Monoschichten (sogenannte self-assembled monolayers) auf der Oberfläche der Wellenleiter ausbilden. Ohne weitere Darstellung von
10 Experimenten wurde vorgeschlagen ω -funktionalisierte langkettige Alkylphosphate in der Biosensorik zu verwenden, wobei die funktionelle Gruppe in ω -Position von der Wellenleiteroberfläche weg zeigen soll und über diese funktionelle Gruppe Erkennungselemente gebunden werden könnten.

15 Im US-Patent 4 904 634¹⁸ wird ein aktives Material beschrieben, das als Adsorbens verwendet werden kann. Dieses Material besteht aus einer Metalloxid/-hydroxid Oberfläche und einer chemisch daran gebundenen Monolage eines phosphorhaltigen organischen Materials. Das phosphorhaltige organische Material wird dort wie folgt näher spezifiziert:

20

- das organische Material besitzt 1-2 phosphorhaltige Gruppen.
- die Phosphorhaltigen Gruppen haben die allgemeine Formel $\text{RR}'\text{PO}(\text{OH})$ oder $\text{RR}'\text{PO}(\text{OH})$, wobei R aus einer bis 30 kohlenstoffhaltigen Gruppen besteht und R' entweder aus Wasserstoff oder aus einer bis 30 kohlenstoffhaltigen Gruppen besteht.

25

- R oder R' kann auch ein organisches Radikal aus der Gruppe von lang- oder kurzkettigen aliphatischen Kohlenwasserstoffen, aromatischen Kohlenwasserstoffen, Carbonsäuren, Aldehyden, Ketonen, Aminen, Amiden, Tioamiden, Imiden, Lactamen, Anilinen, Pyridinen, Piperidinen, Carbohydraten, Estern, Lactonen, Ethern, Alkenen, Alkinen, Alkoholen, Nitrilen, Oximen, Organosiliconen,

30

Harnstoffen, Thioharnstoffen, Perfluoro-Verbindungen (organisch), Perchloro-Verbindungen, Perbromo-Verbindungen und Kombinationen dieser Gruppen.

- R oder R' kann auch eine funktionelle Gruppe an einer Position im Molekül besitzen, die von der phosphorhaltigen Gruppe entfernt ist. Die funktionelle Gruppe kann eine Carboxyl-, Glucose-, Cyano, Cyanat-, Isocyanat, Thiocyanat, Phenyl-,
5 Diphenyl-, tertiäre Butyl-, Sulfonsäure-, Benzylsulfon-, Halogen-, Nitrat-, Phosphat-, Phosphinat-, Phosphinit-, Phosphonat, Hydroxymethylamid, Alkoxy-methylamid, Benzophenon, Azid, Triazen, Acylphosphan-, quartäre Ammoniumgruppe oder Kombinationen aus diesen Gruppen sein.
 - R oder R' kann auch eine Kationaustauschgruppe Gruppe tragen, wie $-\text{HSO}_3$,
10 $-\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$, $-\text{COONa}$, $-\text{NH}_2$ und $-\text{CN}$.
 - R kann auch ein Oligomer sein, das aus 2-4 Monomeren aufgebaut ist und ein Molmasse von $< 2.000 \text{ g/mol}$ besitzt.
- 15 Als Anwendung wird von einem aktiven Material gesprochen, das als Adsorbent geeignet ist. Weitere erwähnte Anwendungen sind:
- Trägermaterial für die Chromatographie.
 - Ionenaustauschermaterial.
 - 20 • Kopplungselement für biologisches Material wie Enzymen, Antikörper, Zellen, Hefen, Proteine, Mikroben, Pharmazeutika, Vakzine.
 - Beschichtung von Piezokristallen.
 - Beschichtungen zur Passivierung von biologischen Implantaten (Knochen etc.).
 - Additive von medizinischen Produkten.
- 25 In der Patentanmeldung GB 2 221 466¹⁹ werden von dem selben Autor biologisch aktive Partikel beschrieben, die aus einem Metalloxid/-hydroxid Kern aufgebaut sind, an dessen Oberfläche funktionalisierte Organophosphorverbindungen gebunden sind, wie sie auch in US-Patent 4 904 634 beschrieben sind. Das Patent bezieht sich aus-
- 30 schließlich auf biologisch aktive Partikel.

Im US-Patent 4 308 079²⁰ werden Korrosionsinhibitoren für Aluminiumoxidoberflächen beschrieben. Als Inhibitoren werden Aminophosphonate verwendet, die folgende allgemeine Struktur besitzen: NR_3 , NHR_2 , $\text{R}'\text{NR}_2$, $(\text{CH}_2\text{NR}_2)_2$ und $\text{R}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$, wobei R $\text{CH}_2\text{PO}(\text{OH})_2$ ist und R' eine Alkylkette mit
5 1-5 Kohlenstoffatomen. Alternative Anwendungen werden nicht beschrieben.

In der wissenschaftlichen Literatur werden Polyoxyalkylen-diphosphonate beschrieben, mit deren Hilfe Calciumcarbonat²¹ und Magnetit-Nanopartikel²² besser dispergiert werden können. Dafür werden Polymere der Struktur
10 $\text{H}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{PO}_3\text{H}_2$ und $\text{H}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{CH}_2\text{PO}_3\text{H}_2)_2$ mit $20 < n < 70$ verwendet, die an der Oberfläche der Nanopartikel eine Polymerschicht aufbauen. Werden diese Polymere bereits bei der Synthese der Nanopartikel zugesetzt beobachtet man eine enge Größenverteilung. Eine weitere chemische Modifizierung und eine Bindung biologisch aktiver Agenzien an diese polymerbeschichteten
15 Nanopartikel wird diskutiert.

Abgesehen von den im Stand der Technik beschriebenen zu vermeidenden Nachteilen werden bei der Verwendung von optischen Wellenleitern als Bio- oder Chemosensoren an die Grenzfläche Wellenleiter zu Detektionsmedium hohe Anforderungen
20 gestellt:

- Unter den Reaktionsbedingungen der Erkennungsreaktion muss die Grenzfläche Wellenleiter Detektionsmedium stabil sein.
- Erkennungselemente müssen innerhalb der Reichweite des evaneszenten Feldes
25 des Wellenleiters immobilisiert werden.
- Unter den Reaktionsbedingungen der Erkennungsreaktion muss die Immobilisierung der Erkennungselemente stabil sein.
- Die Funktionalität der Erkennungselemente muss auch nach der Immobilisierung noch vorhanden sein.

- Damit nur die spezifische Erkennungsreaktion durch den Signalwandler detektiert wird, muss jede Art von unspezifischer Bindung der zu erkennenden Elemente an die Grenzfläche Wellenleiter Detektionsmedium unterdrückt werden.

5 Gegenstand der Erfindung ist ein phosphorhaltiges Polymer nach Anspruch 1.

Das erfindungsgemäße Polymer eignet sich zur Beschichtung von dielektrischen Materialien, insbesondere von dielektrischen Wellenleiteroberflächen. Die Dicke der Beschichtung beträgt üblicherweise zwischen 0,5 und 700 nm, bevorzugt zwischen
10 0,5 und 200 nm, insbesondere zwischen 0,5 und 10 nm.

Das erfindungsgemäße phosphorhaltige Polymer enthält verschiedene funktionelle Gruppen oder Segmente, um die genannten Anforderungen an die Wellenleiterbeschichtung zu erfüllen:

15

- Die Polymerkomponente P.
- Die phosphorhaltigen Gruppen A des Polymers, die eine stabile Bindung des Polymers an die Oberfläche des Wellenleiters gewährleisten. Dabei sind vorzugsweise zwischen 0,001 und 10 Milliäquivalente (mEq) phosphorhaltige Gruppen pro Gramm Polymer vorhanden, insbesondere 0,01 bis 5 mEq/g, besonders
20 bevorzugt 0,1 bis 3 mEq/g.
- Die funktionellen Gruppen F des Polymers, über die Erkennungselemente direkt oder mit Hilfe eines Crosslinkers kovalent, koordinativ oder über eine andere chemische Bindung an das Polymer und somit an die Oberfläche des Bio- oder
25 Chemosensors immobilisiert werden können. Dabei sind vorzugsweise zwischen 0,001 und 20 Milliäquivalente (mEq) funktionelle Gruppen pro Gramm Polymer vorhanden, insbesondere 0,01 bis 10 mEq/g, besonders bevorzugt 0,5 bis 10 mEq/g.
- Die Segmente U, die die unspezifische Bindung von Proteinen etc. an das Polymer und damit an den Wellenleiter unterdrücken. U kann in dem Polymer fehlen,
30 wenn die Unterdrückung der unspezifischen Bindung bereits durch die Polymer-

komponente erreicht wird. Dabei sind vorzugsweise zwischen 0,001 und 20 Milliäquivalenten (mEq) Segmente U pro Gramm Polymer vorhanden, insbesondere 0,01 bis 10 mEq/g, besonders bevorzugt 0,5 bis 10 mEq/g.

5 **Polymerkomponente P**

Die Polymere können linear, verzweigt oder vernetzt sein und eine mittlere Molmasse von 1.000 bis 10.000.000 g/mol, vorzugsweise 2.100 bis 1.000.000 g/mol, besonders bevorzugt 5.000 bis 500.000 g/mol, äußerst bevorzugt 5.000 bis 300.000 g/mol, insbesondere 10.000 bis 150.000 g/mol aufweisen. Sie können statistisch oder
 10 blockweise aufgebaut sein. Typischerweise handelt es sich dabei um hydrophile Polymere, wobei im Rahmen der erfindungsgemäßen Lehre unter einem hydrophilen Polymer ein mit Wasser bzw. wässrigen Lösungen benetzbares oder quellbares Polymer verstanden wird. Beispiele dafür sind:

- 15 • Polyvinylalkohole, Polyvinylamin, Polyallylamin, Polyethylenimin, Polyacrylate, Polyacrylamide, Imide von Polymaleinsäureanhydrid-alt-methylvinylether oder Derivate davon.
- Lineare Polyethylenglycole, Polypropylenglycole oder Derivate davon.
- Verzweigte oder sternförmige Polyethylenglycole wie in US 5 171 264 beschrieben²³ oder Derivate davon.
- 20 • Polyharnstoffe, Polyurethane, Polyester, Polycarbonate, Polyhydroxycarbonsäuren oder Derivate davon, die aus hydrophilen Diolen/Polyolen und/oder Diaminen/Polyaminen aufgebaut sind. Die hydrophilen Dirole/Polyole können Polyethylenglycole, Polypropylenglycole etc. sein. Die Diamine/Polyamine können
- 25 Jeffamine, Polyethylenimine, Polyvinylamin, Polyallylamin, Polyethylenimin etc. sein.
- Polysaccharide wie Cellulose, Stärke, Agarose, Dextran, Chitosan, Hyaluronsäure oder Derivate davon, insbesondere Hydroxyalkylderivate oder saure Halbester.
- Polypeptide oder Derivate davon, die aus einer oder mehreren verschiedenen Aminosäuren aufgebaut sind, wie z.B. Polylysin, Polyphenylalaninlysin, Polyglu-
- 30

tamat, Polymethylglutamatglutamat, Polyphenylalaninglutamat, Polyserin, Polyglycin, Polyseringlycerin etc.

- Verzweigte Polyole auf Glycidolbasis wie in der Patentanmeldung EP 0 116 978 beschrieben oder Derivate davon.

5

Phosphorhaltige Gruppen A

Eine stabile Verankerung des Polymers auf der Wellenleiteroberfläche wird durch mehrere phosphorhaltige Gruppen erreicht, die direkt oder über einen Spacer S an ein Kohlenstoffatom der Polymerkomponente gebunden sind.

10

Die Gruppen A genügen vorzugsweise der Formel

$$A = S_s Y_p,$$

15

in der

p für die Zahl 1 und

s für die Zahl 0 (d.h. $A = Y$) oder 1 (d.h. $A = SY$) steht

20

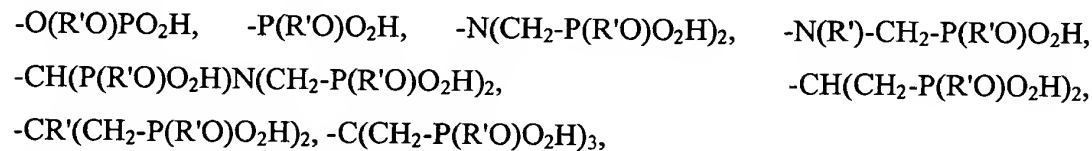
oder

p für die Zahl 2, 3, 4, 5 oder 6 und

s für die Zahl 1 steht (d.h. $A = SY_p$)

25

und in der die Gruppe bzw. Gruppen Y aus folgenden phosphorhaltigen Radikale ausgewählt ist bzw. sind:



30

wobei R' für -H, -CH₃ oder -C₂H₅ steht.

Vorzugsweise enthält das Polymer eine oder mehrere der folgenden Gruppen Y:

$-O(R'O)PO_2H$, $-P(R'O)O_2H$, $-N(CH_2-P(R'O)O_2H)_2$,

insbesondere $-N(CH_2-P(R'O)O_2H)_2$,

5 wobei R' bevorzugt für -H steht.

Der Spacer S ist direkt an ein C-Atom des Polymers gekoppelt und trägt p gleiche oder unterschiedliche phosphorhaltige Radikale Y. Erfindungsgemäß bevorzugt sind folgende Spacer (Gruppe(n) Y sind mit angegeben):

10 $-(CH_2)_q-(O-CH_2-CH_2)_r-Y$, $-(CH_2)_q-(O-CH_2-CH_2-CH_2)_r-Y$,
 $-(CH_2)_q-(O-CH_2-CH_2)_r-C_6H_4Y$, $-(CH_2)_q-(O-CH_2-CH_2)_r-C_6H_3Y_2$,
 $-(CH_2)_q-(O-CH_2-CH_2)_r-C_6H_2Y_3$,

wobei q für Zahlen von 0 bis 20 und r für Zahlen 0 bis 100 steht.

15

Bevorzugt sind folgende Gruppen A, die direkt an ein C-Atom des Polymers gekoppelt sind:

$-PO_3H_2$, $-NH-CH_2-CH_2-PO_3H_2$, $-CH_2-N(CH_2-PO_3H_2)_2$, $-N(CH_2-PO_3H_2)_2$,
 $-(CH_2)_4-N(CH_2-PO_3H_2)_2$, $-OPO_3H_2$.

20

Funktionelle Gruppen F zur Immobilisierung von Erkennungselementen

F steht für funktionelle Gruppen, die direkt an ein Kohlenstoffatom des Polymers gebunden sind, und über die Erkennungselemente direkt oder mit Hilfe eines Cross-linkers kovalent, koordinativ oder über eine andere chemische Bindung an das Polymer und somit an die Oberfläche des Bio- oder Chemosensors immobilisiert werden können. Die direkte Kopplung der Erkennungselemente kann vor der Beschichtung der Wellenleiter mit dem Polymer erfolgen oder danach. Typische funktionelle Gruppen, um Erkennungselemente kovalent zu immobilisieren, sind z.B.:

25 Carbonsäure, Carbonsäureester, Carbonsäurechlorid, Carbonsäureanhydrid, Carbonsäurenitrophenylester, Carbonsäurenitrophenylester, Carbonsäure-N-hydroxy-sucinimid, Carbonsäureimidazolid, Carbonsäure-pentafluorophenylester, Hydroxy,

30

5 Toluolsulfonyl, Trifluoromethylsulfonyl, Epoxy, Aldehyd, Keton, β -Dicarbonyl, Isocyanat, Thioisocyanat, Nitril, Amin, Aziridin, Hydrazin, Hydrazid, Nitro, Thiol, Disulfid, Thiosulfit, Halogen, Jodacetamid, Bromacetamid, Chloracetamid, Borsäureester, Maleimid, α,β -ungesättigte Carbonyle, Phosphat, Phosphonat, Hydroxymethylamid, Alkoxymethylamid, Benzophenon, Azid, Triazen, Acylphosphan.

Alternativ können die Erkennungselemente auch koordinativ an das Polymer immobilisiert werden, Typische Gruppen dafür sind zum Beispiel:
Iminodiessigsäure, Nitrilotriessigsäure.

10

Alternativ können biochemische Erkennungsreaktionen genutzt werden, um Erkennungselemente an das Polymer zu immobilisieren. Dazu können folgende Gruppen an das Polymer gebunden werden:

15 StrepTag²⁴, Digoxin, Digoxigenin, Biotin, Thiobiotin, Fluorescein, Dinitrophenol, Streptavidin, Avidin, etc.

20 Alternativ können vor oder nach der Beschichtung der Wellenleiter Crosslinker an das Polymer gebunden werden. Diese Crosslinker können lineare, verzweigte oder vernetzte Moleküle, Oligomere oder Polymere mit einer Molmasse bzw. mittleren Molmasse von 50 bis 50.000 sein, die zwei oder mehr identische oder verschiedene funktionelle Gruppen tragen, oder andere kommerzielle Crosslinker sein. Diese Crosslinker lassen sich allgemein mit der Formel

25 $P1(F1)_m(F2)_n$ mit $m, n = 0, 1, 2, \dots, 100$, bevorzugt mit $m+n \geq 2$, bevorzugt mit $m, n = 1, 2$ oder 3 beschreiben.

P1 kann sein:

- Lineare oder verzweigte Alkyl- oder Arylreste mit 1-10 C-Atomen.
- Lineare Polyethylenglycole, Polypropylenglycole, Copolymerisate dieser Polymere oder Derivate davon.

30

- Verzweigte oder sternförmige Polyethylenglycole wie in US 5 171 264 beschrieben²⁵ oder Derivate davon.
- Polysaccharide wie Cellulose, Stärke, Agarose, Dextran, Chitosan, Hyaluronsäure oder Derivate davon.
- 5 • Polypeptide oder Derivate davon, die aus einer oder mehreren verschiedenen Aminosäuren aufgebaut sind, wie z.B. Polylysin, Polyphenylalaninlysin, Polyglutamat, Polymethylglutamatglutamat, Polyphenylalaninylglutamat, Polyserin, Polyglycin, Polyseringlycerin etc.
- Verzweigte Polyole oder Oligoole auf Glycidolbasis wie in der Patentanmeldung EP 0 116 978 beschrieben oder Derivate davon.

F1 sind funktionelle Gruppen, die eine Kopplung des Crosslinkers an die funktionellen Gruppen F des Polymers erlauben. F2 sind funktionelle Gruppen, an die Erkennungselemente über eine kovalente, koordinative oder über eine andere chemische Bindung gebunden werden können. F1 und F2 können gleiche oder unterschiedliche funktionelle Gruppen sein. Beispiele für die Gruppen F1 und F2 sind folgende funktionelle Gruppen:

Carbonsäure, Carbonsäureester, Carbonsäurechlorid, Carbonsäureanhydrid, Carbonsäurenitrophenylester, Carbonsäure-N-hydroxysucinimid, Carbonsäureimidazolid, Carbonsäure-pentafluorophenylester, Hydroxy, Toluolsulfonyl, Trifluoromethylsulfonyl, Epoxy, Aldehyd, Keton, β -Dicarbonyl, Isocyanat, Thioisocyanat, Nitril, Amin, Aziridin, Diazirin, Hydrazin, Hydrazid, Nitro, Thiol, Dithiol, Thiosulfit, Halogen, Jodacetamid, Bromacetamid, Chloracetamid, Borsäureester, Maleimid, α,β -ungesättigte Carbonyle, Phosphat, Phosphonat, Hydroxymethylamid, Alkoxymethylamid, Benzophenon, Azid, Triazen, Acylphosphan.

Segmente U zur Unterdrückung von unspezifischer Bindung

Das Polymer kann Segmente U besitzen, die die unspezifische Bindung von Proteinen etc. an das Polymer und damit an den Wellenleiter unterdrücken. Diese Segmente sind kovalent an der Polymereinheit P angebunden und können hydrophile

lineare, verzweigte oder vernetzte Oligomere oder Polymere mit einer Molmasse bzw. mittleren Molmasse von 100 bis 10.000 sein. Beispiele für solche Segmente sind:

- 5 • Lineare Oligo- oder Polyethylenglycole, Oligo- oder Polypropylenglycole, Copolymerisate dieser Oligomere bzw. Polymere oder Derivate davon.
- Verzweigte oder sternförmige Oligo- oder Polyethylenglycole wie in US 5 171 264 beschrieben²⁶ oder Derivate davon.
- 10 • Oligo- oder Polysaccharide wie Cellulose, Stärke, Agarose, Dextran, Chitosan, Hyaluronsäure oder Derivate davon.
- Oligo- oder Polypeptide oder Derivate davon, die aus einer oder mehreren verschiedenen Aminosäuren aufgebaut sind, wie z.B. Polylysin, Polyphenylalaninlysin, Polyglutamat, Polymethylglutamatglutamat, Polyphenylalaninylglutamat, Polyserin, Polyglycin, Polyseringlycerin etc.
- 15 • Verzweigte Polyole oder Oligoole auf Glycidolbasis wie in der Patentanmeldung EP 0 116 978 beschrieben oder Derivate davon.

Diese Segmente können in dem Polymer fehlen, wenn die Unterdrückung der unspezifischen Bindung bereits durch die Polymerkomponente erreicht wird.

Herstellung des Polymers

Das erfindungsgemäße Polymer kann hergestellt werden, indem z.B. unterschiedliche Monomere die die Gruppen A, F und U enthalten nach Verfahren, die dem versierten synthetischen Chemiker bekannt sind, copolymerisiert werden. So kann das Polymer z.B. durch Copolymerisation von Vinylphosphonsäure, Polyethylenglykolmethyletheracrylat und Acrylsäure hergestellt werden. Vor oder nach Aufbringen des Polymers auf die Wellenleiteroberfläche kann dann das Erkennungselement gebunden werden. Dazu werden die Carbonsäuregruppen durch Umsetzung z.B. mit Carbodii-
25 miden aktiviert und dann mit nukleophilen funktionellen Gruppen des Erkennungselementes umgesetzt, was zu einer kovalenten Anbindung des Erkennungselementes an das Polymer führt.
30

Alternativ können aber auch nach bekannten Verfahren Polymere synthetisiert werden, die identische oder unterschiedliche funktionelle Gruppen F besitzen. In weiteren Schritten können dann die phosphorhaltigen Gruppen A und gegebenenfalls
5 Segmente U eingeführt werden. Dabei wird darauf geachtet, dass nur ein bestimmter Teil der Gruppen F umgesetzt wird. Über die verbleibenden Gruppen F können dann die Erkennungselemente gebunden werden. Bei Polymeren, die z.B. Hydroxylgruppen als funktionelle Gruppen F tragen, können durch die Umsetzung mit Polyphosphorsäure die phosphorhaltigen Gruppen A erzeugt werden. Dabei wird nur ein Teil
10 der Hydroxylgruppen umgesetzt. Vor oder nach Aufbringen des Polymers auf die Wellenleiteroberfläche kann dann das Erkennungselement gebunden werden. Dazu werden die Hydroxylgruppen durch Umsetzung z.B. mit Toluolsulfonsäurechlorid aktiviert und dann mit nukleophilen funktionellen Gruppen des Erkennungselementes umgesetzt, was zu einer kovalenten Anbindung des Erkennungselementes an das
15 Polymer führt.

Das Polymer kann z.B. auch aus Polymeren hergestellt werden, die Carbonsäuregruppen oder Derivate davon tragen. Durch Umsetzung z.B. mit Aminoethylphosphonsäure oder $\text{H}_2\text{N}-(\text{C}_6\text{H}_4)_2-\text{N}(\text{CH}_2\text{PO}_3\text{H}_2)_2$ werden die phosphorhaltigen
20 Gruppen A eingeführt. Dabei wird nur ein Teil der Carbonsäuregruppen umgesetzt. Vor oder nach Aufbringen des Polymers auf die Wellenleiteroberfläche kann dann das Erkennungselement gebunden werden. Dazu werden die Carbonsäuregruppen durch Umsetzung z.B. mit Carbodiimiden aktiviert und dann mit nukleophilen funktionellen Gruppen des Erkennungselementes umgesetzt, was zu einer Kovalenten
25 Anbindung des Erkennungselementes an das Polymer führt.

Werden aminhaltige Polymere wie z.B. Polyethylenimin, Polyvinylamin, Polyallylamin oder Polylysin nach Mannich-Mödrizter mit Formaldehyd und phosphoriger Säure umgesetzt, können so die phosphorhaltigen Gruppen A eingeführt werden.
30 Dabei wird nur ein Teil der Amingruppen umgesetzt. Vor oder nach Aufbringen des Polymers auf die Wellenleiteroberfläche kann dann das Erkennungselement gebun-

den werden. Dazu werden die Amingruppen durch Umsetzung z.B. mit einem bifunktionellen Crosslinker wie Ethylenglycolbissuccinimidylsuccinat umgesetzt. Dabei werden aktivierte Carbonsäuregruppen eingeführt, an die nukleophile Gruppen des Erkennungselementes binden können.

5

Aufbringung des Polymers auf die Wellenleiter

Die phosphorhaltigen Gruppen A eignen sich bevorzugt für die Verankerung des Polymers auf Wellenleitern aus Materialien wie TiO_2 , Ta_2O_5 , ZrO_2 , HfO_2 , Al_2O_3 , SiO_2 ($\text{Si}(\text{Ti})\text{O}_2$), $\text{In}_2\text{O}_3/\text{SnO}_2$ (ITO), Aluminumsilicate, Nb_2O_5 , Vanadiumoxide, oder Mischungen dieser Materialien. Die Wellenleitermaterialien können aber auch Oxide oder Hydroxide folgender Elemente sein, die Oxide oder Hydroxide bilden können: Sc, Y, Ti, Zr, Hf, V, Nb, Ta, Cr, Mo, W, Mn, Tc, Re, Fe, Ru, Os, Co, Rh, Ir, Ni, Pd, Pt, Cu, Ag, Au, Zn, Cd, Hg, B, Al, Ga, In, Tl, Ge, Sn, Pb, As, Sb, Bi, Lanthanide, Actinide und Mixturen davon ebenso wie Mixturen von Gruppe IIa (Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra) und VIb (Se, Te, Po)).

10
15

Das Polymer wird aus organischer oder wässriger Lösung auf die Wellenleiteroberflächen aufgebracht. Dies kann durch Inkubation in der Lösung, Tauchen, Sprühen, Spotten, Spincoating oder ähnliche übliche Verfahren geschehen. Typischerweise werden Lösungen zwischen 0,001 und 1.000 g/l, insbesondere zwischen 0,1 und 10 g/l, verwendet und die Wellenleiteroberflächen bei Temperaturen zwischen 0 und 200°C, insbesondere zwischen 20 und 30°C, beschichtet. Die Inkubationszeit der Wellenleitermaterialien mit den Polymer-Lösungen kann zwischen 10 s und 48 h liegen, typischerweise zwischen 10 min und 24 h. Nach der Inkubation werden die Wellenleiter mit organischen Lösungsmitteln oder wässrigen Lösungen gespült und gegebenenfalls weiter derivatisiert.

20
25

Immobilisierung der Erkennungselemente am Polymer

Erkennungselemente können direkt oder mit Hilfe eines Crosslinkers kovalent, koordinativ oder über eine andere chemische Bindung an die funktionellen Gruppen F des Polymers und somit an die Oberfläche des Bio- oder Chemosensors immobilisiert werden. Die direkte Kopplung der Erkennungselemente kann vor der Beschichtung der Wellenleiter mit dem Polymer erfolgen oder danach. Die Erkennungselemente können über eigene funktionelle Gruppen wie Carbonsäure, Carbonsäureester, Carbonsäurechlorid, Carbonsäureanhydrid, Carbonsäurenitrophenylester, Carbonsäure-N-hydroxysuccinimid, Carbonsäureimidazolid, Carbonsäure-pentafluorophenylester, Hydroxy, Toluolsulfonyl, Trifluoromethylsulfonyl, Epoxy, Aldehyd, Keton, β -Dicarbonyl, Isocyanat, Thioisocyanat, Nitril, Amin, Aziridin, Hydrazin, Hydrazid, Nitro, Thiol, Disulfid, Thiosulfit, Halogen, Jodacetamid, Bromacetamid, Chloracetamid, Borsäureester, Maleimid, α,β -ungesättigte Carbonyle, Phosphat, Phosphonat, Hydroxymethylamid, Alkoxymethylamid, Benzophenon, Azid, Triazen, Acylphosphan, an die funktionellen Gruppen F des Polymers kovalent gebunden werden. Die Kombination welche funktionelle Gruppe des Erkennungselementes mit welcher funktionellen Gruppe des Polymers reagiert ergibt sich aus den dem Chemiker bekannten Reaktionsmöglichkeiten zwischen den funktionellen Gruppen.

Proteine als Erkennungselemente können z.B. über ihre Aminosäureseitenketten an dem Polymer immobilisiert werden. Speziell Aminosäuren wie z.B. Lysine, Cysteine, Serine, Tyrosine, Histidine, Glutamate, Aspartate, die an der Oberfläche eines Proteins lokalisiert sind besitzen funktionelle Gruppen in ihren Seitenketten, die eine kovalente Bindung mit den funktionellen Gruppen des Polymers eingehen können. Funktionelle Gruppen können auch in den Erkennungselemente auch durch Derivatisierung (Phosphorylierung von Tyrosinen), Oxidation (z.B. Oxidation von Dioleinen glycosilierter Proteine zu Aldehydgruppen), Reduktion (z.B. von Disulfidbrücken zu Thiolen) oder Kopplung eines Crosslinkers erzeugt werden.

30

Neben der kovalenten Immobilisierung der Erkennungselemente an das Polymer können die Erkennungselemente auch koordinativ an das Polymer gebunden werden. Mit Methoden der Molekularbiologie können z.B. Proteine wie Enzyme, Antikörperfragmente und Rezeptoren mit speziellen Affinitätssequenzen wie z.B. dem 6xHistidin-Tag²⁷ hergestellt werden. Diese Affinitätssequenzen besitzen eine hohe Affinität und Spezifität zu Metallionenkomplexen wie z.B. Nickel Nitrilotriessigsäure oder Kupfer Iminodiessigsäure, die als funktionelle Gruppe F in das Polymer eingebracht sein kann.

Alternativ können auch biochemische Erkennungsreaktionen genutzt werden, um Erkennungselemente an das Polymer zu immobilisieren. Die sehr spezifische und hochaffine Bindung von Biotin an Streptavidin²⁸ kann zur Immobilisierung von Erkennungselementen an das Polymer genutzt werden. Dazu müssen die funktionellen Gruppen F des Polymer z.B. Streptavidin sein. Das Erkennungselement wird dann mit Biotin funktionalisiert und kann so an das Polymer gebunden werden. Alternativ kann das Erkennungselement molekularbiologisch oder chemisch mit einer kurzen Aminosäuresequenz versehen werden, dem sogenannten StrepTag²⁴, der ebenfalls eine hohe Spezifität und Affinität für Streptavidin aufweist.

Vorteile

Multifunktionelle Polymere zur Bio- und Chemofunktionalisierung chemisorbieren aus organischer oder wässriger Lösung auf Wellenleiteroberflächen. Sie bilden aufgrund der spezifischen Bindung der phosphorhaltigen Gruppen an Wellenleitermaterialien eine stabile Schicht auf dem Wellenleiter aus. Die Bindung ist über einen weiten pH-Bereich (pH=1 bis pH=14), Temperaturbereich (0°C bis 100°C) wie auch gegenüber hohen Salzkonzentrationen (1M) stabil. Auch die Anwesenheit von Detergenzien in der Reaktionslösung führt nicht zu einer Desorption des Polymers von der Wellenleiteroberfläche. Da das Polymer über die phosphorhaltigen Gruppen spezifisch auf die Wellenleiteroberfläche gebunden werden, kann ganz im Sinne einer Chemisorption nur eine Monolage an Polymer auf der Oberfläche aufgebracht wer-

den. Die Dicke der Polymerschichten auf der Oberfläche ist somit selbstlimitierend und kann über die mittlere Molmasse und die chemische Struktur des Polymers gezielt eingestellt werden. Damit kann sichergestellt werden, dass die Erkennungselemente innerhalb des evaneszenten Lichtfeldes und somit im sensitiven Detektionsbereich des Signalwandlers immobilisiert werden.

Spezielle Segmente des Polymers bzw. die Polymerkomponente verhindern sehr effektiv die unspezifische Bindung von Proteinen und anderen organischen wie anorganischen Verbindungen an die Wellenleiteroberflächen. Damit ist es möglich sehr spezifisch nur die gewünschte Erkennungsreaktion mit Hilfe des Signalwandlers zu detektieren. Somit wird sowohl die Spezifität des Sensors erhöht wie auch das Signal-Rausch-Verhältniss deutlich verbessert.

Die Erkennungselemente werden über kovalente, koordinative oder andere chemische Bindungen stabil an das Polymer gebunden. Eine Desorption der Erkennungselemente vom Polymer wird so vermieden. Ein weiterer Effekt der sehr geringen unspezifischen Wechselwirkung des Polymers mit Proteinen und anderen organischen Molekülen stellt die hohe Aktivität der immobilisierten Erkennungselemente dar. Die Erkennungselemente sind sehr spezifisch an das Polymer gebunden, weitere unspezifische Wechselwirkungen der Erkennungselemente mit dem Polymer, die zu einer Verringerung der Aktivität der Erkennungselemente führen könnten, treten nicht bzw. nur in sehr geringen Maße auf.

Verwendung

Das Polymer kann auf verschiedenste Wellenleiternmaterialien aufgebracht werden. An das Polymer können dann Erkennungselemente unter Erhalt ihrer Aktivität immobilisiert werden. Das Polymer agiert somit als Interface, um Erkennungselementen auf Signalwandlern wie z.B. Wellenleitern zu immobilisieren. Das Polymer ermöglicht somit die Integration von Erkennungsreaktion und Signalwandler zu einem Sensor. Aufgrund des flexiblen Konzepts des Polymers können die unterschiedlichsten

Erkennungselemente immobilisiert werden, so dass der Sensor in der Umweltanalytik, dem Nahrungsmittelbereich, der Human- und Veterinärdiagnostik und dem Pflanzenschutz eingesetzt werden kann, um Analyten qualitativ und/oder quantitativ zu bestimmen. Da das Polymer die unspezifische Bindung von organischen, anorganischen Verbindungen und Makromolekülen an die Sensoroberfläche verhindern, können auch Analyten in komplexen Proben wie z.B. Umgebungsluft, verschmutztem Wasser oder Körperflüssigkeiten ohne oder nur mit geringer vorherige Aufreinigung qualitativ oder quantitativ bestimmt werden.

10 Zusätzlich kann das Polymer auch in der (bio-)chemischen Forschung und Wirkstoffsuche eingesetzt werden, um mittels eines geeigneten Signalwandlers parallel oder sequentiell die Interaktion zwischen zwei unterschiedlichen Substanzen zu untersuchen. Damit kann z.B. die Interaktion von biologisch aktiven Substanzen, wie z.B. potentiellen Wirkstoffen mit Biomolekülen wie Proteinen, Membranrezeptoren, Ionenkanälen, DNA, RNA etc. untersucht werden.

15

Beispiele**Beispiel 1: Polymer aus phosponatfunktionellen Copolymeren.**

5 Eine Mischung aus 50 g NMP, 5 g Vinylphosphonsäure, 10 g Triethylamin, 15 g Methacryloxyethylacetoacetat, 30 g Polyethylenglykolphosphonacrylat (Molmasse 750 g/mol), 0,5 g Azobisisobutyronitril und 1,5 g Dodecylmercaptan wurde 6 h auf 65°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung in Ethanol auf eine Konzentration von 0,1 mg Polymer pro ml Lösung eingestellt und die Wellenleiteroberflächen in dieser Lösung 18 h inkubiert. Danach wurden die Wellenleiter mit Ethanol und 10 mM (M = mol/l) NaOH gespült. Es wurde eine Lösung von 2 mg/ml monoklonaler Maus-Antikörper gegen Myoglobin in 10 mM Natriumacetatpuffer, eingestellt auf pH = 5, hergestellt und die Wellenleiteroberflächen 2 h darin inkubiert. Es wurde eine Oberflächenkonzentration von Antikörper von 1,5 ng/mm² erhalten.

15

Beispiel 2: Polymer aus Phosphatestern von Polyvinylalkohol.

Eine Mischung aus 50 g einer 10 %igen Lösung von Polyvinylalkohol (Polyvinylacetat mit einem Verseifungsgrad von 88 % und einer Höppler-Viskosität der 4 %igen Lösung in Wasser von 18) in DMSO und 0,1 % Polyphosphorsäure wurde 15 min auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 10 g Bernsteinsäureanhydrid zu der Lösung gegeben und bei 21°C für 3 h gerührt. Im nächsten Schritt wurde die Lösung in Ethanol auf eine Konzentration von 1 mg Polymer pro ml Lösung eingestellt und die Wellenleiteroberflächen in dieser Lösung 18 h inkubiert. Danach wurden die Wellenleiter mit Ethanol und 10 mM NaOH gespült. Die Oberfläche wurde 10 min in einer Lösung von 1 M N-Hydroxysuccinimid und 1 M N-Dimethylaminopropyl-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid in Reinstwasser inkubiert und danach mit Reinstwasser gespült. Es wurde eine Lösung von 2 mg/ml monoklonaler Maus-Antikörper gegen Myoglobin in 10 mM Natriumacetatpuffer, eingestellt auf pH = 5, hergestellt und die Wellenleiteroberflächen 2 h darin inkubiert. Es wurde eine Oberflächenkonzentration von Antikörper von 2,5 ng/mm² erhalten.

30

Beispiel 3: Polymer aus imidisierten MSA-Copolymeren.

5 Eine Mischung aus 9,5 g 2-(2-Aminoethoxy)-ethanol, 1,11 g Aminomethanphosphonsäure, 1 g Triethylamin und 100 ml Wasser wurde portionsweise bei 70°C mit 15,6 g Polymaleinsäureanhydrid-alt-methylvinylether (MW (mittlere Molmasse) = 216.000 g/mol) versetzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung in Ethanol auf eine Konzentration von 10 mg Polymer pro ml Lösung eingestellt und die Wellenleiteroberflächen in dieser Lösung 18 h inkubiert. Danach wurden die Wellenleiter mit 10 Ethanol und 10 mM NaOH gespült. Die Oberflächen wurden in einer 10 mg/ml Lösung von Ethylenglycolbissuccinimidylsuccinat in DMSO 30 min inkubiert und danach mit DMSO und Reinstwasser gespült. Es wurde eine Lösung von 2 mg/ml monoklonaler Maus-Antikörper gegen human chorionic Gonadotropin in 10 mM Natriumacetatpuffer, eingestellt auf pH = 5, hergestellt und die Wellenleiteroberflächen 15 2 h darin inkubiert. Es wurde eine Oberflächenkonzentration von Antikörper von 2,0 ng/mm² erhalten.

Beispiel 4: Polymer aus phosphonatfunktionellen Copolymeren gepfropft mit Polyglycidol.

20

Herstellung der Pfropfgrundlage (fettsäuremodifiziertes Polyglycidol):

Eine Mischung aus 28 g Sojaölfettsäure und 74 g Epoxypropanol (Glycidol) wurde 1 h auf 140°C erhitzt und dann innerhalb von 6 h eine Mischung aus 0,4 g Phosphorsäure und 333,5 g Epoxypropanol hinzudosiert. Dann wurde 16 h bei 140 °C nachge- 25 rührt.

Eine Mischung aus 20 g des zuvor hergestellten fettsäuremodifizierten Polyglycidols, 20 g Methacryloyloxyethylacetoacetat, 2 g Vinylphosphonsäure, 2 g Triethylamin, 42 g NMP und 0,4 g Azobisisobutyronitril wurde 16 h auf 65°C und 1 h auf 100°C 30 erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung in Ethanol auf eine Konzentration von 3 mg Polymer pro ml Lösung eingestellt und die Wellenleiteroberflächen in dieser

Lösung 10 h inkubiert. Danach wurden die Wellenleiter mit Ethanol und 10 mM NaOH gespült. Es wurde eine Lösung von 2 mg/ml monoklonaler Maus-Antikörper gegen Myoglobin in 10 mM Natriumacetatpuffer, eingestellt auf pH = 5, hergestellt und die Wellenleiteroberflächen 2 h darin inkubiert. Es wurde eine Oberflächenkonzentration von Antikörper von 3,5 ng/mm² erhalten.

Beispiel 5: Polymer aus acetoacetoxy- und phosphatestermodifiziertem Dextran.

Eine Mischung aus 10 g Dextran (MW = 40.000 g/mol), 7g Acetessigsäure-tert-butylester, 100 g DMSO und 0,5 g Polyphosphorsäure wurde 4 h auf 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung in Ethanol auf eine Konzentration von 1 mg Polymer pro ml Lösung eingestellt und die Wellenleiteroberflächen in dieser Lösung 8 h inkubiert. Danach wurden die Wellenleiter mit Ethanol und 10 mM NaOH gespült. Es wurde eine Lösung von 2 mg/ml Streptavidin in 10 mM Natriumacetatpuffer, eingestellt auf pH = 5, hergestellt und die Wellenleiteroberflächen 2 h darin inkubiert. Es wurde eine Oberflächenkonzentration von Streptavidin von 4,5 ng/mm² erhalten.

Beispiel 6: Polymer aus phosphonatfunktionellem Polylysin.

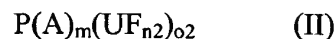
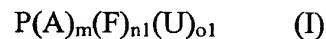
500 mg Poly-L-Lysin-hydrobromid (MW = 150.000 bis 300.000 g/mol), 170 mg phosphorige Säure und 4 ml Wasser wurden auf 100°C erhitzt und dann 324 mg Formalin (37 %ig) hinzugegeben. Es wurde 1 h bei 100°C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung in Ethanol auf eine Konzentration von 1 mg Polymer pro ml Lösung eingestellt und die Wellenleiteroberflächen in dieser Lösung 2 h inkubiert. Danach wurden die Wellenleiter mit Ethanol und 10 mM NaOH gespült. Die Oberflächen wurden mit einer Lösung von 10 mg/ml Carboxymethyldextran (MW = 15.000 g/mol), 0,1 M N-Hydroxysuccinimid und 0,1 M N-Dimethylaminopropyl-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid in Reinstwasser 20 min inkubiert. Danach wurden die Oberflächen kurz mit Reinstwasser gespült und sofort mit 0,1 mg/ml einer amin-

funktionalisierten DNA (20 Nucleotide) in 10 mM Natriumacetatpuffer (pH = 5) inkubiert. Es wurde eine Oberflächenkonzentration von DNA von $0,5 \text{ ng/mm}^2$ erhalten.

Patentansprüche

1. Phosphorhaltiges Polymer, geeignet zur Beschichtung von dielektrische Oberflächen, der allgemeinen Formeln I oder II,

5



10

in denen

P für eine lineare oder verzweigte, unvernetzte oder vernetzte, homo- oder heteropolymere Polymerkomponente,

15

A für gleiche oder verschiedene, an P gebundene phosphorhaltige Gruppen,

m für eine Zahl von 3 bis etwa 1000,

20

F für gleiche oder verschiedene, direkt oder indirekt an P gebundene funktionelle Gruppen,

n1 für eine Zahl von 1 bis etwa 1000,

25

n2 für eine Zahl von 1 bis etwa 100,

U für gleiche oder verschiedene, an P gebundene, lineare oder verzweigte, unvernetzte oder vernetzte, aus gleichen oder verschiedenen Monomeren aufgebaute oligomere oder polymere Segmente,

30

o1 für eine Zahl von 0 bis etwa 1000 und

o2 für eine Zahl von 1 bis etwa 1000 steht.

- 5 2. Polymer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es phosphorhaltige Gruppen A in einer Menge von 0,001 bis 1 mEq (Milliäquivalente), vorzugsweise 0,01 bis 5 mEq, insbesondere 0,1 bis 3 mEq, enthält.
- 10 3. Polymer nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es funktionelle Gruppen F in einer Menge von 0,001 bis 20 mEq, vorzugsweise 0,01 bis 10 mEq, insbesondere 0,5 bis 10 mEq, enthält.
- 15 4. Polymer nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es Segmente U in einer Menge von 0,001 bis 20 mEq, vorzugsweise 0,01 bis 10 mEq, insbesondere 0,5 bis 10 mEq, enthält.
- 20 5. Polymer nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer eine mittlere Molmasse von 1.000 bis 10.000.000 g/mol, vorzugsweise 2.100 bis 1.000.000 g/mol, besonders bevorzugt 5.000 bis 500.000 g/mol, äußerst bevorzugt 5.000 bis 300.000 g/mol, insbesondere 10.000 bis 150.000 g/mol aufweist.
- 25 6. Polymer nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerkomponente P ein statistisches Copolymer oder Block-Copolymer ist.
- 30 7. Polymer nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerkomponente P hydrophil ist.
8. Polymer nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es phosphorhaltige Gruppen A in Form eines ein bis sechs gleiche oder verschiedene phosphorhaltige Reste tragenden Spacer enthält.

- 5
9. Polymer nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es funktionelle Gruppen F enthält, die kovalente Bindungen, koordinative Bindungen oder biochemische Erkennungsreaktionen eingehen können.
- 10
10. Polymer nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es funktionelle Gruppen F mit Crosslinkern enthält.
11. Polymer nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Segmente U eine Molmasse bzw. mittlere Molmasse von 100 bis 10.000 aufweisen.
- 15
12. Polymer nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Gruppen bzw. Segmente U hydrophil sind.
- 20
13. Verwendung eines Polymers nach einem der vorstehenden Ansprüche zur Beschichtung von dielektrischen Materialien, insbesondere von dielektrischen Wellenleitern.
- 25
14. Verwendung nach dem vorstehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer zur Beschichtung von dielektrischen Materialien, insbesondere von dielektrischen Wellenleitern, aus TiO_2 , Ta_2O_5 , ZrO_2 , HfO_2 oder Al_2O_3 , bevorzugt aus TiO_2 oder Ta_2O_5 , verwendet wird.
- 30
15. Optischer Signalwandler mit einem beschichteten dielektrischen Wellenleiter, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtung aus einem Polymer nach einem der Ansprüche 1 bis 12 besteht.
16. Verwendung eines optischen Signalwandlers mit einem beschichteten dielektrischen Wellenleiter dem vorstehenden Anspruch zur Immobilisierung von chemischen und/oder biochemischen Erkennungselementen.

- ¹ Beste, G.; Schmidt, F. S.; Stibora, T.; Skerra A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) **96**, 1898-1903.
- ² Tiefenthaler et al.; US 4 815 843 (1989).
- ³ Kunz, R.; US 5 442 169 (1995).
- ⁴ Duveneck, G. L.; Neuschäfer, D.; Ehrat, M.; US 5 959 292 (1999).
- ⁵ Duveneck, D. L.; Heming, M.; Neuschäfer, D.; Segner, J.; EP 0 759 159 (1995).
- ⁶ Neuschäfer, D.; Duveneck, G. L.; Pawlak, M.; Pielles, U.; Budach, W.; WO 96/35940 (1996).
- ⁷ Clerc, D. and Lukosz, W.; *Sensors and Actuators B* (1997) **40**, 53-58.
- ⁸ Barner, R.; Fattinger, C.; Huber, W.; Hübscher, J.; Schlatter, D.; Europäische Patentanmeldung EP 0 596 421
- ⁹ Budach, W.; Abel, A. P.; Bruno, A. E.; Neuschäfer, D.; *Anal. Chem.* (1999) **71**, 3347-3355
- ¹⁰ Piehler, J.; Brecht, A.; Geckeler, K. E.; Gauglitz, G.; *Biosensors & Bioelectronics* (1996) **11**, 579-590.
- ¹¹ Schneider, B. H.; Dickinson, E. L.; Vach, M. D.; Hoijer, J. V.; Howard, L. V.; *Biosensors & Bioelectronics* (2000) **15**, 13-22.
- ¹² Piehler, J.; Brecht, A.; Geckeler, K. E.; Gauglitz, G.; *Biosensors & Bioelectronics* (1996) **11**, 579-590.
- ¹³ Kenausis, G. L.; Vörös, J.; Elbert, D.L.; Huang, N.; Hofer, R.; Ruiz-Taylor, L.; Textor, M.; Hubbel, J. A.; Spencer, N.D.; *J. Phys. Chem. B* (2000) **104**, 3298-3309.
- ¹⁴ Sigrist, H.; Gao, H.; Korth, C.; Moser, M.; Oesch, B.; Kunz, R.; Duebendorfer, J.; *Europäische Patentanmeldung EP 0 887 645* (1998).
- ¹⁵ Herron, J. N.; Christensen, D. A.; Wang, H.; Caldwell, K. D.; Janatová, V.; Huang, S.; *US 5 919 712*, (1999).
- ¹⁶ Barié, N.; Gobet, J.; Rapp, M.; Sigrist, H.; *Patentanmeldung DE 198 18 360* (1999).
- ¹⁷ Brovelli, D. et al.; *Langmuir* (1999) **15**, 4324-4327
- ¹⁸ Wieserman, L. F.; Wefers, K.; Cross, K.; Martin, E. S.; *US 4 904 634* (1990).
- ¹⁹ Wieserman, L. F.; DeYoung, D. H.; Whitesides, G. M., *Patentanmeldung GB 2 221 466* (1990).
- ²⁰ Venables, J. D.; Tadros, M. E.; Ditchek, B. M.; *US 4 308 079* (1981).

-
- ²¹ Mosquet, M.; Chevalier, Y.; Brunel, S.; Guicquero, J. P.; Le Perchec, P.; *J. Appl. Poly. Sci.* (1997) **65**, 2545-2555.
- ²² Dumazet-Bonnamour, I. and Le Perchec, P.; *Colloids and Surfaces* (2000) **173**, 61-71.
- ²³ Merrill, E. W.; *US 5 171 264* (1992).
- ²⁴ Skerra, A.; Schmidt, T. G. M.; *Biomolecular Engineering* (1999) **16**, 79-86.
- ²⁵ Merrill, E. W.; *US 5 171 264* (1992).
- ²⁶ Merrill, E. W.; *US 5 171 264* (1992).
- ²⁷ Porath, J. *Protein Expr. Purif.* (1992) **3**, 263-281.
- ²⁸ Buckland, R. M.; *Nature* (1986) **320**, 557.